

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-153870

(P2001-153870A)

(43)公開日 平成13年6月8日(2001.6.8)

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	テマコード(参考)
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/566	2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/50	P 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/50		C 1 2 N 15/00	A
審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 5 頁)			

(21)出願番号 特願平11-334120

(22)出願日 平成11年11月25日(1999. 11. 25)

(71)出願人 000233055

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
社

神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地

(72)発明者 田中 俊明

神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
社内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外2名)

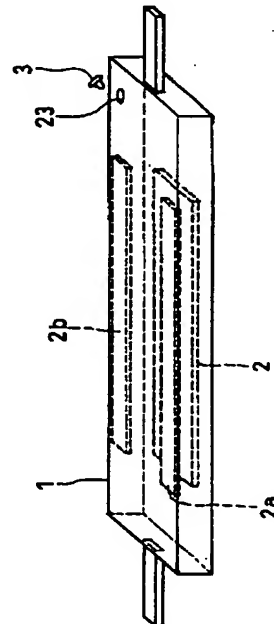
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ハイブリダイゼーション装置、ケース、支持体、及び、標識試薬

(57)【要約】

【課題】 ハイブリダイゼーション反応の効率を高め、反応時間を短縮することができ、さらに、検出感度を高めることができるハイブリダイゼーション装置、ケース、支持体、及び、標識試薬を提供すること。

【解決手段】 ケース1は、白金被膜チタンから成りその上にプローブDNAを固定化した金属支持体2と、金属支持体2との間に電圧を印加するための対向電極2a及び対向電極2bと、キャップ3と、注入口23とで構成されている。これによりハイブリダイゼーション反応を短時間で効率的に行うことができる。また検出に電気化学発光物質を使うことができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 ハイブリダイゼーション反応溶液に電荷を供給する金属を有することを特徴とするハイブリダイゼーション反応用の支持体。

【請求項2】 生体物質が固定されている請求項1記載の支持体。

【請求項3】 ハイブリダイゼーション反応溶液に電荷を供給する電極を有することを特徴とするハイブリダイゼーション反応用のケース。

【請求項4】 請求項1又は2記載の支持体を収容していることを特徴とする請求項3記載のケース。

【請求項5】 ハイブリダイゼーション反応用のケースに、反応溶液に電荷を供給する電気を供給することを特徴とするハイブリダイゼーション装置。

【請求項6】 生体物質に標識する電気化学発光物質を有することを特徴とする標識試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ハイブリダイゼーション装置、該装置内でハイブリダイゼーション反応を行うためのケース、該ケース内でハイブリダイゼーション反応を行うための支持体、及び、ハイブリダイゼーションのために生体物質に標識する標識試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】従来のハイブリダイゼーション反応は、絶縁体であるガラスプレートから成る支持体上にプローブを固定し、その上から蛍光標識したサンプルを含むハイブリダイゼーション反応溶液を滴下しカバーガラスをのせ、一定時間恒温槽に放置する方法で行っていた。その後、恒温槽から支持体を取り出して洗浄液で支持体を洗浄し、検出器によって標識に用いた蛍光物質を励起させその蛍光を読み取ることで、プローブとハイブリダイズを形成するサンプルを同定することができる。なお、上記プローブ及びサンプルはいずれも生体物質であり、具体的にはDNA又はRNAである。DNAとRNAとのハイブリダイゼーションの場合もある。また、支持体上にサンプルを固定し、ハイブリダイゼーション反応溶液中の蛍光標識したプローブとハイブリダイゼーション反応をさせる場合もある。ここでは支持体上に固定したDNAプローブと、標識したDNAサンプルとをハイブリダイゼーション反応させる場合を例にして説明するが、本発明はこれに限られない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】上述した従来の方法でハイブリダイゼーション反応を行うと、反応時間が6～7時間にわたる等、長時間を要していた。このため、高価な多数のハイブリダイゼーション装置を並べて置いて、多数のハイブリダイゼーション反応を同時併行して行うのが普通であり、そのための広い設置スペースを確保しなければならなかった。本発明の目的は、ハイブリ

ダイゼーション反応の効率を高め、反応時間を短縮することができ、さらに、検出感度を高めることができるハイブリダイゼーション装置、ケース、支持体、及び、標識試薬を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明の支持体は、ハイブリダイゼーション反応溶液に電荷を供給する金属を有するものである。これにより、反応溶液に電荷を供給することができ、ハイブリダイゼーション反応溶液中の生体物質を支持体側に引き寄せることができる。また、電気化学発光物質を標識試薬として用いることができる。

【0005】また、該支持体に生体物質が固定されていることで、例えば特定の病気の診断等に直接用いることができる。さらに、本発明のケースは、ハイブリダイゼーション反応溶液に電荷を供給する電極を有するものである。

【0006】また、該ケースは、上記支持体を収容していることで、上記同様にそのケースを特定の病気の診断等に直接用いることができる。また、本発明のハイブリダイゼーション装置は、ハイブリダイゼーション反応用のケースに、反応溶液に電荷を供給する電気を供給するものである。また、本発明の標識試薬は、生体物質に標識する電気化学発光物質を有するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】以下、添付図面を参照しながら本発明の好適な実施の形態について詳細に説明する。図1は、本発明の一実施の形態によるハイブリダイゼーション反応に用いるケースの構成を示す斜視図である。ケース1は金属支持体2と対向電極2aと対向電極2bとキャップ3と注入口23で構成されている。

【0008】ケース1は、反応結果を光学的に検出できるようにするために透明であって、かつ耐薬品性が求められるのでアクリル樹脂で構成するのが好適である。その内側下部中央に金属支持体2を固設し、金属支持体2の両側上部の位置に対向電極2a及び対向電極2bを固設し、上から観察する際に対向電極2a及び対向電極2bが妨げにならないようにする。

【0009】金属支持体2は例えば25×75×2mm³とし、その上にプローブDNAを固定化する。このため金属支持体2には表面の均一性が求められ、更に電極としての安定性が求められるので、本実施の形態では白金被膜チタンを用いた。この場合対向電極2a及び対向電極2bは、透明でないので、冷却CCDでの検出の邪魔にならない位置に付けなければならない。対向電極2a及び対向電極2bを透明の電極で形成するのであれば、金属支持体2の上の位置に金属支持体2と同じ大きさの電極を1つ固設するようにしてもよい。

【0010】図2は、本発明の実施の形態によるハイブリダイゼーション装置の構成を示す図である。ケース1の中に金属支持体2を載置し、ハイブリダイゼーション

反応溶液を注入してキャップ3でふたをしてケース1を密閉する。そのケース1を加熱するためにベルチェ4の上に乗せる。ベルチェ4もコンピュータ13につながっており、反応温度も調節可能にする。さらに、電源スイッチ5によって、金属支持体2をプラス側にして金属支持体2と対向電極2a及び2bとの間に電圧を印加することにより反応溶液に電界を印加しておいてハイブリダイゼーション反応をさせる。電源スイッチ5はコンピュータ13につながっていて、コンピュータ13で制御できる。このハイブリダイゼーション反応のために印加する電圧は約100V程度である。反応終了後は、ポンプ14によりケース1内のハイブリダイゼーション反応溶液を排出チューブ6を経て、排液だめ8に排出する。この際、未反応のサンプルDNA16（図3参照）はハイブリダイゼーション反応溶液と一緒に排出される。その後、洗浄溶液だめ9より注入チューブ7を経て洗浄溶液をケース1内に注入し、同様に排液だめ8に排出する。本実施の形態では洗浄溶液として、0.2XSSC/0.1%SDS溶液を用いた。さらに、TPA溶液だめ9より後述する電気化学発光に必要なTPA（Tripropylamine）溶液をケース1内に注入する。この際、注入する溶液の選択は切替スイッチ15によって行う。TPA溶液注入後、再度、電源スイッチ5をONにし、金属支持体2に電圧を印加して電気化学発光させる。この電気化学発光のために流す電流は約100 μ A程度である。ただし、これは後述するRu²⁺をRu³⁺に酸化するのに必要な電流であるので装置としては50～150 μ A（可変）で最適な発光量を調節する。この発光をケース1上の冷却型CCDカメラ11で検出する。検出終了後、ケース1内のTPA溶液はポンプ14により排出される。検出したデータはA/Dコンバータ12を介してコンピュータ13に送られる。

【0011】図3は、本発明の実施の形態におけるハイブリダイゼーション反応を説明する図である。ハイブリダイゼーション反応のとき、電源スイッチ5をONにし電圧を印加することにより、-（マイナス）に帯電するサンプルDNA16はケース1内で、+（プラス）に帯電する金属支持体2に引き寄せられ、金属支持体2上のプローブDNAとの反応機会が増え、反応効率が高くなる。これによりハイブリダイゼーション反応の短時間化を可能にする。反応中はベルチェ4によりケース1を下部より加熱し、反応温度を一定に保つ。

【0012】図4は、本発明の実施の形態におけるルテニウム錯体18を導入したサンプルDNA16の構造を説明する図である。ハイブリダイゼーション反応溶液のサンプルDNA16には、電気化学発光物質を修飾させる。本装置では発光物質にルテニウム錯体18を用い、電子供与物質にTripropylamine（TPA）17を用いることで、電気化学発光による検出を可能にする。本実施の形態では架橋剤としてN-ヒドロキシスクシンイミド活

性化エステル（NHSエステル）19を用い、NHSエステル19にストレプトアビジン20を結合させる。一方、サンプルDNA22をビオチン21によりビオチン化させる。これにより、ストレプトアビジン・ビオチン結合により、サンプルDNA22にルテニウム錯体18を導入することができる。サンプルDNA22のビオチン化については、ピアス社他数社から市販のビオチン化キットを用いて行える。

【0013】図5は、本発明の実施の形態における電気化学発光を説明する図である。このように、あらかじめサンプルDNA22に修飾させたルテニウム錯体18は、金属支持体2に電圧を印加するとTPA17と反応し、発光する。図6及び図7は、金属支持体2上でのルテニウム錯体18とTPA17の反応を説明する図である。TPA17はまず電極板上で電子を1個放出した後、陽イオンラジカル（TPA⁺）になる。陽イオンラジカルは非常に不安定で、陽子（H⁺）を放出してラジカルになるがこれもまだ不安定なため、Ru³⁺と反応して電子を1個放出する。一方、Ru²⁺は、電極板上で電子を1個放出してRu³⁺になり、TPAラジカルと反応して電子を1個もらうが、そのままでは不安定な状態（励起状態；Ru²⁺*）にあり、photon（光子）を放出して安定なRu²⁺に戻る。

【0014】なお、本発明は上記実施の形態に限定されるものではない。金属支持体としては、白金被膜チタンの他に、白金板、ステンレス板、及び、チタン/白金クラッド等でもよい。チタン/白金クラッドはチタン薄板の上に白金薄板を乗せてボルトで止めたものである。白金被膜チタンはチタンの基板に白金をメッキしたものである。メッキの一般的な特徴として表面に分子レベルの凹凸があり、その分、他に例示した白金板、ステンレス板、及び、チタン/白金クラッドよりも電極としての効率が良い。また、金属支持体は金属によって良導電体となっているものであればよく、例えば、ガラスのような絶縁体の基板に金属を被覆したものでもよい。さらに、表面に金属が露出している必要はなく、金属を溶液から守るため金属の表面に薄い誘電体を被覆する等していても、金属支持体から溶液に電荷を供給することができる程度、且つ、ルテニウム錯体及びTPAが反応することができる程度に金属によって良導電体となっているものであればよい。

【0015】

【発明の効果】以上のように、本発明によれば、ハイブリダイゼーション反応を短時間で効率的に行うことができる。また、検出に電気化学発光物質を用いることで繰り返し検出が行え、電極から供給する電荷の量・時間を調節することにより、試料に応じた適正な発光量を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施の形態によるハイブリダイゼー

ション反応に用いるケースの構成を示す斜視図である。

〔図2〕本発明の実施の形態によるハイブリダイゼーション装置の構成を示す図である。

〔図3〕本発明の実施の形態におけるハイブリダイゼーション反応を説明する図である。

〔図4〕本発明の実施の形態におけるルテニウム錯体を導入したサンプルDNAの構造を説明する図である。

〔図5〕本発明の実施の形態における電気化学発光を説明する図である。

〔図6〕金属支持体上でのルテニウム錯体とTPAの反応を説明する図である（その1）。

〔図7〕金属支持体上でのルテニウム錯体とTPAの反応を説明する図である（その2）。

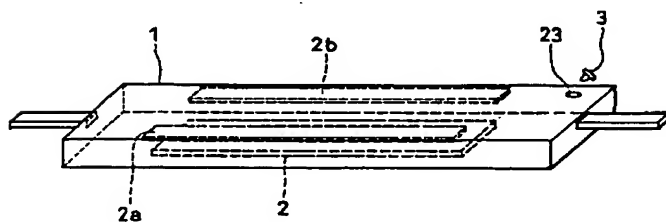
〔符号の説明〕

- 1 ケース
- 2 金属支持体
- 2a 対向電極
- 2b 対向電極
- 3 キャップ
- 4 ベルチェ

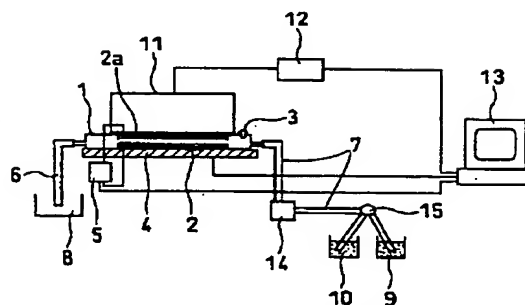
- * 5 電源スイッチ
- 6 排出チューブ
- 7 注入チューブ
- 8 排液だめ
- 9 洗浄溶液だめ
- 10 TPA溶液だめ
- 11 冷却型CCDカメラ
- 12 A/Dコンバータ
- 13 コンピュータ
- 14 ポンプ
- 15 切替スイッチ
- 16 サンプルDNA
- 17 TPA
- 18 ルテニウム錯体
- 19 エステル
- 20 ストレプトアビジン
- 21 ビオチン
- 22 サンプルDNA
- 23 注入口

*20

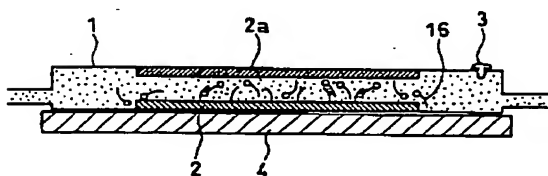
〔図1〕



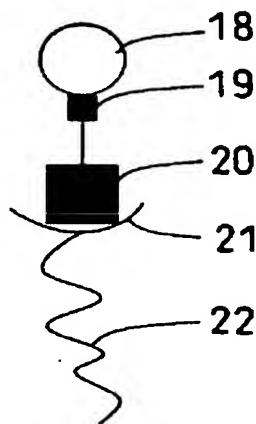
〔図2〕



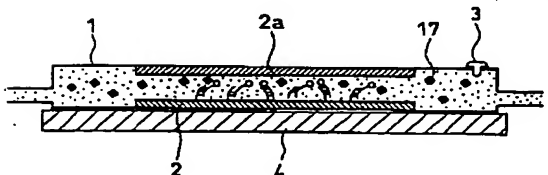
〔図3〕



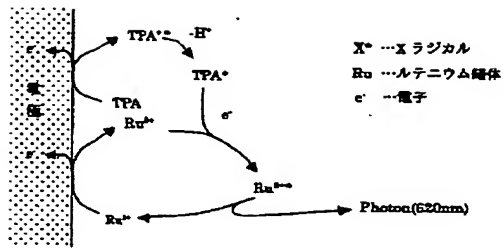
〔図4〕



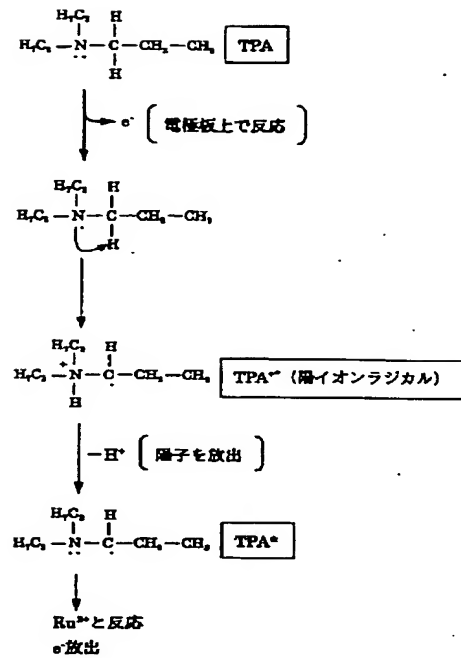
〔図5〕



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 山本 顕次
 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
 社内
 (72)発明者 畑野 浩一郎
 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
 社内

(72)発明者 水野 克也
 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
 社内
 Fターム(参考) 2G045 AA25 AA35 BB50 DA12 DA13
 DA14 FA34 FB02 FB05 FB07
 FB12
 4B024 AA11 AA19 CA01 CA09 CA11
 HA13
 4B029 AA07 AA23 CC02 CC03 FA15
 4B063 QA01 QQ03 QQ42 QQ52 QR32
 QR51 QR56 QR66 QR82 QS34
 QS39 QX02 QX04